

図 2. 17 β-エストラジオール(E2)の
OVX ラットに対する効果

* P<0.05(vs.OVX)

ルにより OVX による破骨細胞面(Oc.S/BS)の上昇および骨形成率(BFR/BS)の上昇は、ともに用量依存的に sham レベル以下にまで低下した。これに対して、図 3 に示したように、ED-71 は、OVX により減少した腰椎骨密度を投与量に応じて増加させ、0.1 µg/kg の用量では、骨密度が sham レベルまで、0.2 µg/kg の用量においては骨密度が sham レベル以上に増加した。腰椎の骨形態計測の結果、ED-71 の低用量にお

いては、OVX により上昇した破骨細胞面(Oc.S/BS)の上昇および骨形成率(BFR/BS)は、17 β-エストラジオールと同様にともに低下した。一方、0.2 µg/kg の用量においては、低用量から認められた骨吸収パラメーターの低下は保持されたまま、さらに PTH と同様な骨形成パラメーターの上昇が観察された。同様な結果は、骨形成パラメーターとしてオステオカルシン、骨吸収パラメーターとして尿中デオキシピリジノリン排泄量で比較した場合においても確認された。

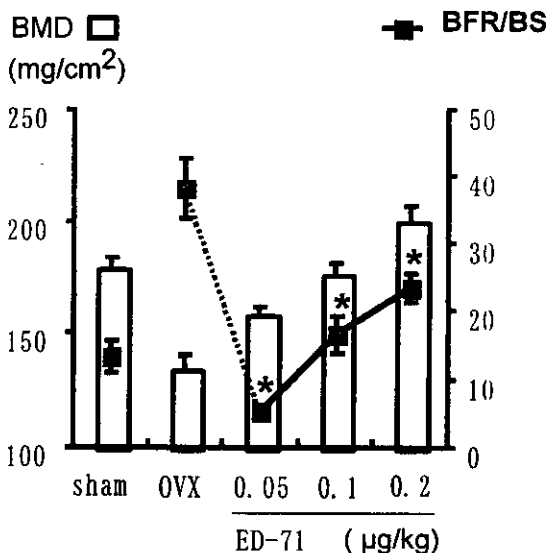
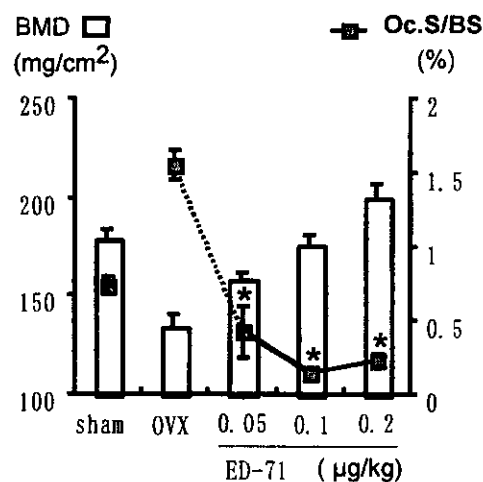


図 3. ED-71 の OVX ラットに対する効果

* P<0.05(vs.OVX)

＜実験 2.骨吸収マーカー、尿中 Ca 排泄、血中 PTH 濃度に対する用量依存性の比較＞

図 4 に示すように尿中 Ca 排泄は ED-71 の投与量に応じて増加し、0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で有意な増加を示した。一方、血中 PTH 濃度は、図 5 に示すように、ED-71 の 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で低下する傾向を示した。これに対して、OVX で増加した骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン排泄量(Dpyr/Cr)は、ED-71 の 0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ においてすでに有意に抑制されていた。

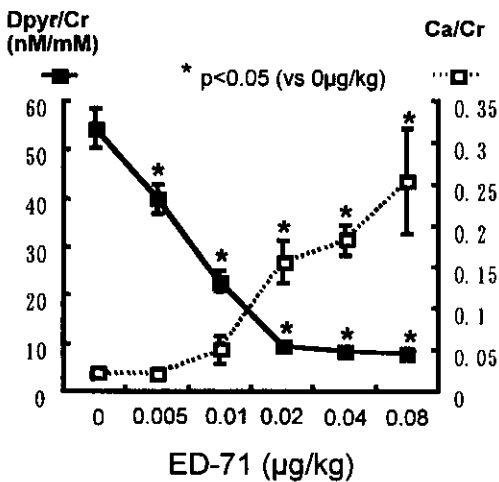


図 4. 尿中 Ca 排泄と骨吸収マーカーの変化

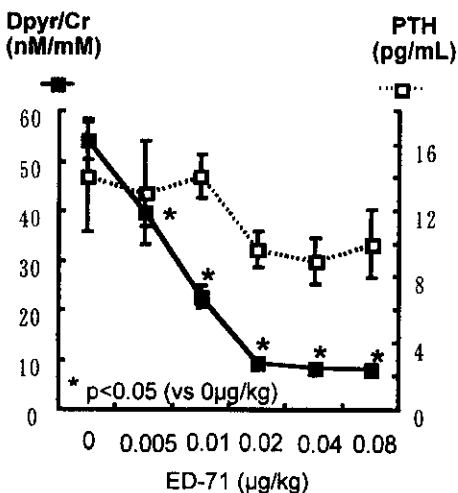


図 5. 血中 PTH 濃度と骨吸収マーカーの変化

D.考察

今回、我々は、ED-71 の骨作用の作用機序について明確にするために、まず ED-71 投与した卵巣摘除(OVX)ラットにおける骨密度増加作用と骨形成パラメーターおよび骨吸収パラメーターの変化を骨形成促進剤の PTH あるいは骨吸収抑制剤の 17 β -エストラジオールでの変化と比較する実験を実施した。骨形成促進剤の PTH においては、用量依存的な骨密度の増加作用と、これに一致した骨形成パラメーターの増加が認められた(図 1)。また、骨吸収マーカーは僅かな上昇を示した。一方、骨吸収抑制剤の 17 β -エストラジオールでは、OVX による骨密度の低下を用量依存的に予防し、これに一致した骨吸収パラメーターの低下が認められた(図 2)。これらの結果に対して、ED-71 では、低用量においては、17 β -エストラジオールと同様に骨吸収パラメーターおよび骨形成パラメーターはともに低下したが、至適用量においては、低用量から認められた骨吸収パラメーターの低下は保持されたまま、さらに PTH と同様な骨形成パラメーターの上昇が観察された。したがって、ED-71 は、骨吸収抑制作用と骨形成促進作用を併せ持ち、その骨作用は、低用量では骨吸収抑制作用を介して、至適用量においては骨吸収抑制作用に加えて骨形成促進作用を介して発揮されると考えられた(図 6)。

OVX モデルにおける ED-71 による骨形成促進作用は、Ca 吸収促進作用と骨芽細胞活性化作用を介する可能性についてウサギ脚延長モデルの研究により昨年度明らかにしたが、OVX モデルにおける ED-71 による骨吸収抑制作用については、依然として明確な答えが得られていない。活性型ビタミン D の骨粗鬆症モデルにおける骨吸収抑制作用については、腸管

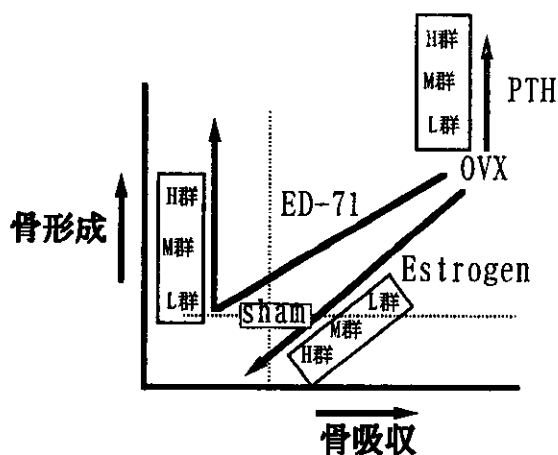


図6. ED-71の作用機序

からのCa吸収促進作用あるいは副甲状腺におけるPTH分泌抑制作用が主たるメカニズムと考えられている。そこで、ED-71について、骨吸収パラメーターと尿中Ca排泄促進作用(=腸管からのCa吸収促進作用)と副甲状腺でのPTH分泌抑制作用の用量反応性の比較を行った。その結果、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン排泄量(Dpyr/Cr)の低下は、尿中Ca排泄の増加とPTH分泌抑制作用に伴って認められたことから、ED-71における骨吸収抑制作用においても、これらの作用が重要な役割を果たしていると考えられた。しかし、ED-71の骨吸収パラメーターの有意な抑制は、尿中Ca排泄の増加と血中PTH濃度の低下が全くみられない投与量においてすでに認められていることから、これらの投与量においては、別のメカニズムを介して破骨細胞の形成を阻害され、骨吸収が抑制されている可能性が示唆された。活性型ビタミンDの主な標的組織は、副甲状腺、腸管、腎臓および骨と考えられていることから、今後は、さらに骨に対する直接作用あるいは腎臓に対する作用を想定したメカニズムの解明のための実験を実施していく必要があると考えられた。

E. 結論

本研究により、ED-71は、PTHあるいは17β-エストラジオールとは異なり、骨吸収抑制作用と骨形成促進作用を併せ持ち、その骨粗鬆症モデルにおける骨密度増加作用は、低用量では骨吸収抑制作用を介して、至適用量以上においては骨吸収抑制作用に加えて骨形成促進作用を介して発揮されると考えられた。また、ED-71の骨吸収抑制作用は、従来から言われていた腸管からのCa吸収促進作用および副甲状腺からのPTH分泌抑制作用を介する可能性以外に、これらの機序とは別のメカニズムを介する可能性が示唆された。今後は、例えば骨あるいは腎臓に対する直接作用を想定したメカニズムの解明等の実験を実施していく必要があると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

骨折治癒過程に於けるFGFRおよびサイトカインの発現に関する研究

分担研究者 田村 誠（科研製薬（株）薬理部長）

研究要旨：骨折治癒過程は骨折を起点として局所に遊走する種々の細胞とそれらの細胞から産生されるGF・サイトカインの複雑な相互作用により進行する過程である。我々は正常あるいは治癒が遅延した骨折モデルにおけるbFGFの作用を調べ、bFGFに応答して骨折治癒が促進する難治性骨折モデルを確立した。さらに、正常および治癒遅延病態におけるbFGFとFGFR（1～3）の免疫染色法による局在を調べた。デキサメタゾン（1 mg/ml, 1 ml/kg体重）投与は仮骨骨塩量の形成を低下し骨折部骨強度を正常治癒対照に比べ有意に低下させた。bFGF 50 ug/site投与は有意に仮骨形成を促進し、正常対照以上に上昇させた。免疫染色によるbFGFとFGFRの発現を調べると、bFGFは骨折後早期の増殖性軟骨及び未分化骨原生細胞、骨芽細胞に発現していた。一方、FGFRはR1-R3に特徴的な差は認められなかったが、特にR1では増殖性軟骨と肥大軟骨細胞及び骨芽細胞に強陽性で、骨折後1週から3週までの全ての時点で陽性であった。このように、bFGFとFGFRの発現部位は非常によく一致し、骨折後3週までbFGFとFGFRはそれぞれ機能している可能性が推定された。また、骨折後3日までに局所に遊走される未分化間葉系の細胞自体にはbFGFとFGFRの免疫反応性は認められず、分化が始まった状態からbFGFが作用する可能性が示唆された。現在、in situ hybridization及びnorthern hybridizationで正常と治癒遅延状態でのbFGFとFGFRの局在と定量的変化を解析中である。

A. 研究目的

骨折治癒過程におけるFGFRとbFGFの発現を正常と治癒遅延モデルで比較し、ステロイド投与による骨形成不全病態でのbFGFの骨折治療効果の可能性とその根拠を明確にすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 8週令のSDラット（雄：体重250-270 g）にデキサメタゾンリン酸エステル（1 mg/ml, 1 ml/kg体重）を試験開始1週間前から3回/

週、皮下投与した。骨折作成はラットの右後肢の腓骨を露出し、骨鋏で切断後整復し、bFGF (50 ug/30u) を含浸させた架橋セラチン製剤を骨折部周辺に投薬した。皮膚および筋層を縫合後、1, 3, 5, 7, 10週で屠殺し、腓骨を摘出し、仮骨骨塩量、骨密度をDEXAで測定し、骨強度を3点曲げ骨強度試験機で測定した。

(2) 免疫病理試験：腓骨は中性ホルマリンで固定後、10% DEXAで脱灰し、パラフィンで包埋し薄切した。anti-bFGF, anti-FGFR1—anti-

FGFR3は市販の抗血清を用い、100-150倍希釈して常法どおり染色した。

C. 研究結果

(1) 骨折治癒過程の仮骨形成の変化

骨折後1週の仮骨形成はすべての群でわずかであったが、骨折後3週では最大値(BMC, BMD)を示し、5週以降減少した。bFGFをステロイド無処置対照群に投与すると、3週で有意な仮骨形成を促進し、5週目以降減少するもののその値は有意に高かった。ステロイドを投与すると無処置正常対照に比べ1週目から有意な仮骨体積、骨塩量の減少が認められ、最大仮骨形成を示す3週でも正常対照群に追いつくことはなかった。bFGFをステロイド処置群に投与すると、3週目でステロイド処置対照および無処置対照群に比べ仮骨体積、骨塩量は有意に増加した。

(2) 骨折部骨強度の変化

骨折後1, 3, 5, 7および10週で採取した腓骨の骨強度を3点曲げ骨強度試験機により測定した。無処置正常対照群と比べbFGF投与群では、骨折後3週以降有意な最大荷重および曲げ剛性の増加を示した。ステロイド処置の対照群では無処置対照群に比べ、5週目以降有意な最大荷重および曲げ剛性の低下が認められた。一方、bFGFを投与するとこれらの骨強度のパラメーターは無処置対照群と同程度かそれ以上の増加が認められた。

(3) 組織学的観察

無処置対照群の骨折部は、骨折後1週でその大部分が軟組織で占められ、軟性仮骨を形成していた。3週になると一部に軟骨組織が残っているものの未熟骨からなる硬性仮骨に変化し、骨折部の癒合が進行していた。骨折後5週以降になると軟骨組織は消失し骨折断端は架橋さ

れ、7週目以降はリモデリングにより未熟な骨組織が皮質骨へ置換される像が観察された。ステロイド処置群では、無処置対照群と比べ仮骨形成の抑制が認められたが、治癒過程の遅延は認められなかった。一方、bFGF投与はステロイド処置および無処置にかかわらず、内軟骨性骨化および膜性骨化のいずれも顕著に促進する像が認められた。

(4) 免疫組織学的観察

Anti-bFGFの免疫染色において、無処置対照群の骨折後3日目の切片では既存の骨芽細胞が強く染色されたが、間葉系の細胞には染色性は認められなかった。7日目では、膜性骨形成部位の骨芽細胞、骨原生細胞および内軟骨性骨形成部位の増殖性軟骨細胞が強く染色された。骨折後3週目では軟骨細胞や未分化の骨原生細胞が少なくなるものの、これらの細胞の反応性には変化は認められなかった。Anti-FGFR1-3を用いた免疫染色においても、R1-R3特徴的な差異は認められず、またそれらの染色部位にも変化は認められなかった。特に、FGFR1において骨折後1～3週で骨芽細胞、増殖性軟骨細胞、肥大軟骨細胞に強い染色性が、骨原生細胞に弱い染色性がそれぞれ認められた。しかし、ステロイド投与と無処置あるいはbFGF投与と対照群に特徴的な差は認められず、むしろ染色性の程度に変化が認められた。

(5) In situ hybridizationとnorthern hybridizationによるbFGFおよびFGFR1の局在と発現量の比較

現在、これらの試験を開始したばかりで、明確な結果は得られていない。

D. 考察

(1) bFGFは無処置対照群に比べ骨折部仮骨形成を促進し、骨強度を有意に増加させた。

(2) ステロイド投与は正常な骨形成を抑制し、骨

折部骨強度を有意に低下させた。bFGFをステロイド処置ラットの骨折部に投与すると、骨折部の仮骨形成を促進し、無処置対照と同程度かそれ以上に仮骨形成を促進し、骨強度を増加させた。このようにbFGFはステロイドの骨折治癒の遅延にたいして回復させることが明らかになった。

- (3) 組織学的観察の結果、ステロイドの骨折治癒の遅延は病理組織からは認められず、むしろ質的な差ではなく量的な差ではないかと考えられる。また、bFGFとFGFRの発現をステロイド処置と無処置で比較すると、発現の程度に差が認められた。従って、ステロイド投与はbFGFやそのレセプターの発現量を抑制している可能性が推定された。
- (4) 免疫組織の検討の結果、bFGFとFGFRの発現部位と時期は非常によく相関していた。すなわち、bFGFを産生する骨芽細胞や軟骨細胞はオートクリン的に作用している可能性が考えられた。また、bFGFの骨形成作用はこれまでの検討の結果、骨原生細胞の増殖と考えられたが、増殖反応が終了した骨折後3週の時点でも硬性仮骨内の未熟骨を作る骨芽細胞はどちらのbFGFおよびFGFR 1の抗体でも強く染色された。このことはこれらの時点においてもbFGFが作用する可能性を示唆している。

E. 結論

bFGFは骨折治癒が遅延したステロイド投与ラットの骨折治癒を促進した。

F. 研究発表

- 1.論文発表： なし
- 2.学会発表： なし

G. 知的所有権の取得状況

なし